

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2015.07.10**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2017.01.10**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):

UNIVERSIDADE DO MINHO

LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA

PT

(72) Inventor(es):

JOSÉ ANTÓNIO COUTO TEIXEIRA

PT

ANTÓNIO AUGUSTO MARTINS DE OLIVEIRA SOARES

VICENTE

PT

PHILIPPE EMMANUEL DA CRUZ RAMOS

PT

MIGUEL ÂNGELO RIBEIRO CERQUEIRA

PT

(74) Mandatário:

MARCO ALEXANDRE GOMES DA SILVA PIRES DE SOUSA

RUA QUINTA DO MONTE, 96 - 1º DTº 4805-151 CALDAS DAS

TAIPAS

PT

(54) Epígrafe: **CÁPSULA IMOBILIZADORA DE PROBIÓTICOS PARA A PRODUÇÃO DE MICRONUTRIENTES NO INTESTINO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO CONSISTE NUMA CÁPSULA TRANSPORTADORA DE PROBIÓTICOS COM CAPACIDADE PARA LIBERTAR OS NUTRIENTES NO INTESTINO, SEM DECORRER A LIBERTAÇÃO DOS MICRORGANISMOS. A CÁPSULA CARACTERIZA-SE POR COMPREENDER UM NÚCLEO DE ALGINATO ONDE ESTÃO OS PROBIÓTICOS, SEGUIDO DE UMA CAMADA DE Ɛ-POLI-LLISINA, SEGUIDO DE UMA CAMADA INTERMÉDIA DE ALGINATO E UMA TERCEIRA CAMADA DE QUITOSANO. A REFERIDA CÁPSULA ALTERA O SEU DIÂMETRO QUANDO HÁ VARIAÇÃO DE PHS, AUMENTANDO O MESMO QUANDO O PH É NEUTRO.

RESUMO

Cápsula imobilizadora de probióticos para a produção de micronutrientes no intestino

A presente invenção consiste numa cápsula transportadora de probióticos com capacidade para libertar os nutrientes no intestino, sem decorrer a libertação dos microrganismos.

A cápsula caracteriza-se por compreender um núcleo de alginato onde estão os probióticos, seguido de uma camada de ϵ -poli-L-lisina, seguido de uma camada intermédia de alginato e uma terceira camada de quitosano.

A referida cápsula altera o seu diâmetro quando há variação de pHs, aumentando o mesmo quando o pH é neutro.

DESCRIÇÃO

Cápsula imobilizadora de probióticos para a produção de micronutrientes no intestino

Domínio Técnico

A presente solução refere-se a um novo transportador para a imobilização de probióticos. Mais particularmente, refere-se a uma cápsula de alginato revestida por uma camada de revestimento de ϵ -poli-L-lisina, uma outra camada de alginato e uma terceira camada de quitosano, que contém probióticos no seu núcleo, cuja libertação é apenas dos nutrientes nos intestinos. Esta invenção pode ser aplicada nas áreas da indústria alimentar e farmacêutica.

Estado da técnica

Hoje em dia os consumidores de alimentos têm em mente a enorme importância da relação entre nutrição e saúde e por causa disso, ingredientes funcionais têm tido um desenvolvimento exponencial. A fortificação de alimentos, com compostos ativos, tem sido usada como solução para preencher esta procura, porém estes compostos são na maioria dos casos sensíveis à produção, armazenamento e transporte dos alimentos, o que promove uma diminuição contínua da bioatividade dos compostos, reduzindo a sua biodisponibilidade quando consumidos (Sekhon, 2010). Além disto, existem outros problemas tecnológicos, tais como: manutenção da estabilidade de nutrientes, possíveis interações entre nutrientes, alteração das propriedades físicas, a influência dos alimentos (como um transportador) e a influência de nutrientes no sabor

dos alimentos (Who/Fao, 2006). Outra desvantagem importante no processo de fortificação de alimentos, em que os compostos funcionais estão no seu estado livre, é que estes alimentos/suplementos não são capazes de proporcionar ao consumidor estes compostos funcionais em pequenas quantidades e a uma taxa diária constante. Um dos problemas é a sobredosagem dos compostos funcionais que podem promover alguns problemas de saúde (Loveday & Singh, 2008).

Para ultrapassar estes problemas, vários sistemas de encapsulação têm sido propostos, tais como, a encapsulação de ingredientes funcionais que têm a capacidade de proteger os ingredientes e libertá-los em taxas controladas. Outra característica destes sistemas é a possibilidade de utilizar materiais que são capazes de aderir à mucosa intestinal ou à parede do estômago (Li et al., 2007; Sarker et al., 2015; Suwannateep et al., 2011).

Assim, os sistemas de encapsulação utilizados na indústria alimentar devem: a) ser produzidos usando compostos GRAS (Generally Recognized as Safe); b) serem estáveis em matrizes alimentares; e c) serem capazes de proteger e libertar os compostos funcionais durante a digestão. Apesar de todas estas características, os sistemas produzidos acabam por não ter a eficiência necessária (Sauvant et al., 2012).

A fortificação do folato em alimentos, considerando a dose diária recomendada de 200 µg para adultos e 400 µg para mulheres grávidas, tem sido utilizado usando a forma sintética da vitamina B9, o ácido fólico. No entanto, esta forma acaba por ter uma baixa biodisponibilidade após a produção de alimentos, armazenamento e consumo. Tem ainda outros problemas, tais como: a absorção ineficiente de formas sintéticas pelo organismo humano (de Meer et al., 2005), a capacidade de mascarar a falta de vitamina B12, numa fase inicial (Bailey & Ayling, 2009; Morris & Tangney, 2007), a

alteração da atividade hepática da enzima dihidrofolato redutase (Bailey & Ayling, 2009) e promover cancro (Baggott et al., 2012; Ulrich & Potter, 2006); que são uma prova de que é necessária uma fortificação por uma forma de folato natural. As principais fontes naturais de folato estão presentes em vegetais e produtos lácteos, sendo esta vitamina produzida por plantas e microrganismos, respetivamente. O folato é absorvido principalmente no duodeno e jejuno, onde os diferentes poliglutamatos são hidrolisados e depois reduzidos antes de serem absorvidos. As diferenças entre os folatos naturais e sintéticos, baseiam-se no facto de a forma sintética ter de ser reduzida para ser absorvida, sendo este processo realizado no fígado, em contraste as formas naturais, que são absorvidos diretamente, tornando-as mais biodisponíveis do que o ácido fólico (forma sintética).

Algumas bactérias probióticas são capazes de produzir grandes quantidades de folato, tais como a *Lactococcus lactis cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *B. breve*, *B. infantis* and *B. animalis* e há também outros probióticos capazes de produzir a vitamina B6 e B12. Os probióticos são também capazes de produzir ácido linoleico, um ácido gordo, que é necessário aos tecidos do fígado, cérebro e tecido adiposo (Wall et al., 2009) assim como bacteriocinas que são péptidos antimicrobianos, que podem ser utilizados para proteger o sistema gastrointestinal contra microrganismos indesejáveis (O'Shea et al., 2012).

Os probióticos possuem uma ação no corpo humano limitada por alguns fatores, tais como: uma baixa resistência às condições do estômago (Gueimonde & Salminen, 2006) e um baixo tempo de residência no intestino (Gardiner et al., 2004; Klingberg & Budde, 2006). Outra limitação é, em alguns casos, o contato direto desta bactéria com o intestino humano. Existem alguns trabalhos que mencionam algumas preocupações sobre a

utilização de probióticos em humanos, tais como, a possível passagem dos mesmos do trato digestivo para locais extra-intestinais, levando a infecções (Butel, 2014) e uma estimulação imunológica excessiva por um contacto direto dos probióticos com o intestino, que cria respostas imunológicas contínuas do organismo (Marteau & Shanahan, 2003).

Uma das áreas mais importantes de pesquisa sobre probióticos trata da avaliação do comportamento de libertação dos compostos e nutracêuticos em regiões específicas, indicando onde estes produtos serão mais eficientes. O intestino é o segundo maior superfície do nosso organismo ($250 - 400 \text{ m}^2$), em que as taxas de absorção são mais elevadas e por isso a absorção dos nutrientes é também mais significativa. Portanto, uma proteção eficaz nesta área contra espécies patogénicas é muito importante. Esta região é uma zona muito importante para promover a proliferação probiótica, porque estes são capazes de proteger o intestino e também produzir compostos funcionais que irão ser depois assimilados. Uma solução para a utilização dos probióticos, considerando os problemas acima mencionados, é a encapsulação de probióticos. As cápsulas são capazes de proteger os probióticos contra níveis elevados de oxigénio (Sunohara *et al.* 1995), da interação com os constituintes dos alimentos (Tripathi and Giri 2014), congelação (Azizi *et al.* 2010; Sousa *et al.* 2013) e durante a passagem pelo sistema digestivo (Sun and Griffiths 2000). No entanto, os sistemas convencionais de encapsulação de probióticos têm como objetivo apenas a sua encapsulação até ao intestino, sendo aí libertados. Assim, um sistema de imobilização (encapsulação contínua) capaz de manter o probiótico encapsulado durante a passagem através do sistema gastrointestinal, podendo fornecer vantagens como a prevenção da ativação interfacial, a estimulação da produção e a excreção dos metabolitos secundários para uma utilização contínua torna-se um objetivo a atingir. Para conseguir este resultado, e de modo a aumentar

o tempo de residência dos probióticos no intestino, é necessário desenvolver um sistema inovador e eficiente.

Das soluções existentes, salientam-se as seguintes: o documento de patente US2012258047 refere várias encapsulações/imobilizações de probióticos e células utilizando poli-L-lisina como revestimento. No entanto, não contempla a encapsulação contínua de probióticos durante todo o processo digestivo, mas sim a sua libertação após a entrada em contacto com o meio intestinal.

Outras soluções relevantes referem a encapsulação de probióticos usando um revestimento do quitosano (Ali et al., 2014; Cook et al., 2013). Nestas soluções as cápsulas apresentam apenas 2 materiais para envolver a cápsula de alginato sendo o seu objetivo final a libertação dos probióticos no intestino. É de salientar que os testes digestivos *in vitro* realizados para estas soluções, foram apenas de 1h de tempo de residência a pH 2 e sem enzimas, o que não corresponde de todo à simulação digestiva completa do ser humano.

A solução desenvolvida e que se pretende agora proteger, consiste numa cápsula capaz de imobilizar e transportar probióticos ao longo de todo o sistema gastrointestinal sem libertar os probióticos, promovendo a troca de nutrientes e de produtos (ativação de probiótico) no intestino, pela alteração da porosidade de uma membrana sensível ao pH do meio. Este sistema também é capaz de aderir ao muco intestinal, aumentando assim o tempo de residência do sistema no intestino.

Descrição geral

A descrição atual refere-se a uma cápsula, que funciona como um sistema de imobilização para o transporte de probióticos. Esta cápsula é capaz de encapsular probióticos e capaz de passar ao longo de todo o sistema gastrointestinal, promovendo a troca de nutrientes e de produtos (ativação dos probióticos) no intestino, alterando a porosidade de uma membrana sensível ao pH do meio. Além disso, é capaz de aderir ao muco do intestino que irá aumentar o tempo de residência do sistema no intestino.

A presente invenção consiste numa cápsula de alginato revestida por três revestimentos subsequentes, a criação de um veículo, cujo diâmetro varia entre 10 e 3000 μm . Este sistema tem a capacidade de ser estável em diferentes pHs, por exemplo, 2 e 7, e tem uma elevada permeabilidade em meios com pH neutro (em comparação com pH ácido). Assim, a cápsula é capaz de: encapsular um microrganismo probiótico; ser capaz de passar ao longo de todo o sistema gastrointestinal sem se desintegrar; ser capaz de se aderir ao muco intestinal; e ser capaz de promover a troca de nutrientes e de produtos (ativação dos probióticos) no intestino, alterando a porosidade de uma membrana sensível ao pH do meio, sem libertar os probióticos. Este sistema é capaz de imobilizar probióticos que serão produtores contínuos de micronutrientes, por exemplo o folato (forma natural), no mesmo lugar onde serão assimilados pelo organismo humano, o intestino.

Para produzir o sistema descrito é importante escolher os materiais, considerando as suas possíveis combinações, os procedimentos e métodos necessários. O alginato é o material mais utilizado para a formação de cápsulas, devido ao seu baixo preço, simplicidade e biocompatibilidade. O alginato é

um polissacarídeo extraído de algas castanhas e é composto de forma aleatória por dois ácidos, o 1-4 β -D-manurônico e o ácido α -L-gulurônico, blocos M e blocos G, respectivamente. A relação entre estes dois blocos (rácio M/G) leva a alginatos com características diferentes quando ligado com cálcio tendo uma influência direta na eficiência de encapsulação, inchamento e cinética de libertação de compostos. Na formação de cápsulas, alginatos com uma elevada relação de M/G, serão mais permeáveis e terão uma cinética de libertação de compostos mais rápida. Alginatos com um rácio M/G mais baixo cria estruturas mais fortes, menos permeáveis e mais viscosas quando em solução, devido à maior afinidade dos blocos G com iões de cálcio, em comparação com os blocos M. Para criar a estrutura principal deste tipo de cápsulas é necessário um ião positivo que normalmente é o cálcio (Ca^{2+}), embora outros também possam ser usados. Estes dois compostos criam uma estrutura forte, que, no caso de ser uma cápsula, irá ter diferentes diâmetros, considerando o tipo de técnica de alginato usada para a produção. A estrutura de polissacárido ligado com iões bivalentes cria uma estrutura forte, devido à posição consecutiva de blocos G que irão criar cavidades para os iões de cálcio, em que um ião cálcio pode ser ligado a 4 blocos G diferentes. Este modelo descreve a gelificação ionotrópica do alginato sendo conhecido como o modelo "egg-box".

A montagem da camada-por-camada (layer-by-layer assembly - LbL) tem sido utilizada para aumentar a proteção dos probióticos do ambiente ácido do estômago humano, através da utilização de materiais que por cargas opostas são capazes de se ligar à estrutura principal, neste caso, cápsulas, e também ligar-se entre si, criando uma deposição de revestimentos consecutivos. Utilizando esta técnica diferentes polissacarídeos e proteínas têm sido utilizados. Alginato/ ϵ -poli-L-lisina/alginato é uma combinação bem conhecida de

revestimentos que têm sido utilizados em cápsulas à base de alginato. As interações entre estes dois compostos (alginato e ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PLL)) são baseadas nas interações eletrostáticas entre os grupos aniônicos COO^- presente no alginato e os grupos catiónicos NH_3^+ presentes na ϵ -PLL. As interações eletrostáticas da ϵ -PLL também são reforçadas quando a quantidade de blocos M, presente no alginato, são mais elevadas. Em outras palavras, grupos catiónicos ϵ -PLL têm mais afinidade para blocos M, comparativamente com os blocos também mencionou que diferenças de 20% em quantidades superiores de blocos M, comparando com blocos G são suficientes para uma forte interação entre os materiais. O quitosano tem sido um dos materiais mais utilizados para a proteção dos probióticos, sendo usado como um revestimento em cápsulas de alginato. O quitosano também demonstrou propriedades muco-adesivas, propriedades estas importantes para permitir um aumento do tempo de residência de cápsulas no intestino humano.

Assim, a presente invenção consiste numa cápsula constituída por:

- Um núcleo que consiste numa cápsula de alginato onde probióticos são imobilizados;
- Uma camada de revestimento interno constituída por ϵ -PLL;
- Uma camada de revestimento intermédia constituída por alginato e;
- Uma camada de revestimento externa constituída por quitosano.

A concentração ótima de cada revestimento na sua aplicação à cápsula original tem em conta fatores como:

- a concentração mínima capaz de aderir ao suporte;

- a concentração máxima que origina uma floculação dos ingredientes; e

- as características para se obter a porosidade desejada.

Por tudo isto, considera-se que a concentração de poli-L-lisina deve estar compreendida entre 0,001% e 0,8% (m / v), a concentração de alginato entre 0,001% e 1% (m / v) e a concentração de quitosano entre 0,0005% e 0,9% (m / v).

A produção desta cápsula, com estes materiais específicos, por esta ordem específica, tem como objetivos: a utilização de um alginato capaz de criar um núcleo principal com uma elevada permeabilidade, e por isso é necessário um alginato com alto teor de ácido manurónico (resíduos responsáveis pelo inchamento e menor afinidade por iões de cálcio), que pode ser o alginato de sódio CR 8223 por exemplo, que tem um elevado rácio M/G (65/35) e um elevado peso molecular (aprox. 300 kDa). A utilização de ϵ -PLL como o primeiro revestimento serve para limitar a hidratação contínua da cápsula de alginato que leva à sua destruição em meios iónicos, mas, ao mesmo tempo, tem como função manter a capacidade permeável do sistema. A segunda camada de revestimento, é um alginato capaz de ter uma melhor capacidade para se ligar à primeira camada de revestimento de forma a criar uma estrutura mais forte pela promoção das ligações eletrostáticas entre materiais, isto pode ser feito através do aumento do conteúdo de blocos M (ϵ -PLL tem mais afinidade para os blocos M do que os blocos G) pela utilização do alginato de sódio LFR5 / 60 que tem um rácio M/G de 30/60 e um baixo peso molecular. Uma camada de revestimento de alginato também vai funcionar como uma ligação entre a ϵ -PLL e o quitosano, mantendo a permeabilidade do sistema. O quitosano é o último revestimento (camada externa) e tem dois objetivos: proteger o sistema em ambientes ácidos (principalmente os probióticos encapsulados) e ser responsável pela adesão do sistema ao epitélio intestinal. O quitosano é um polissacarídeo constituído por copolímeros de glucosamina e

N-acetilglucosamina; estas estruturas têm carga positiva, grupos amina, que por interações iônicas criam uma ligação ao muco, ligando-se aos grupos carregados negativamente.

O sistema funcionará pelos seguintes princípios: em primeiro lugar, considerando o aumento de tamanho de pH 2 para pH 7, estômago e intestino, a porosidade do sistema irá aumentar. Este facto, em conjunto com um pH intestinal favorável à ação dos probióticos, dará condições para a ativação dos mesmos dentro das cápsulas. Com isso, a cápsula com uma consequente adesão ao intestino, irá ser um reator estável com um aumento do tempo de residência capaz de produzir nutrientes indispensáveis ao organismo humano, como folato, durante vários dias. Estes compostos serão produzidos no intestino onde serão automaticamente assimilados.

A combinação dos materiais referidos constitui uma matriz porosa capaz de criar uma estrutura permeável a pequenas moléculas mas capaz reter probióticos no seu interior. Esta capacidade é conseguida pelas elevadas concentrações de alginato utilizadas para a produção da cápsula e pela utilização de três camadas (revestimentos) que criam barreiras à saída ou entrada de compostos com altos pesos moleculares. No entanto, mesmo estes revestimentos são permeáveis a compostos com baixos pesos moleculares, tais como reagentes e produtos de uma fermentação. O sistema possui assim a capacidade de reter os probióticos em todos os estados da digestão devido às elevadas dimensões destes organismos comparativamente com a porosidade da matriz.

A utilização desta conjugação de materiais, principalmente utilizando o quitosano como última camada de revestimento, cria uma estrutura resistente aos diferentes meios digestivos. Verifica-se assim que esta solução tem como principais vantagens os probióticos poderem trabalhar como um reator que

será capaz de ser um produtor contínuo de micronutrientes naturais, no exato local onde eles serão assimilados (intestino), aumentando a biodisponibilidade dessas formas bem como a produção controlada desses micronutrientes estar direcionada para as necessidades diárias de nutrição do hospedeiro (quantidades reduzidas e constantes diariamente). Assim, esta solução irá: ser capaz de fornecer micronutrientes no lugar onde serão assimilados de uma forma controlada; permitir que os micronutrientes possam ser vitaminas naturais que serão mais biodisponíveis (ou seja, o processo de absorção será mais eficiente); proteger os probióticos e evitar o seu contacto direto com o muco intestinal; e aumentar o tempo de residência dos probióticos encapsulados no intestino humano.

Em termos técnicos, a utilização da conjugação dos três materiais como camadas, poli-L-lisina, alginato e quitosano, cria uma estrutura única capaz de aumentar o seu tamanho em pH's neutros (o que levará ao aumentando a permeabilidade) e reduzir o seu tamanho em pH's ácidos (diminuindo a permeabilidade). Este facto permite a viabilidade dos probióticos encapsulados em todos os processos de digestão assim como um total aproveitamento das suas capacidades de produção de micronutrientes essenciais para o organismo humano. A utilização do quitosano como última camada faz com que a cápsula seja bioadesiva, sendo capaz de aumentar o tempo de residência dos probióticos encapsulados em comparação aos livres.

Breve descrição das Figuras

Figura 1 - Análise por turbidimetria entre o alginato CR 8223 e a ϵ -poli-L-lisina.

Figura 2 - Análise por turbidimetria entre ϵ -poli-L-lisina e Alginato LFR5/60.

Figura 3 - Ensaio de turbidimetria entre alginato LFR5/60 e quitosano.

Figura 4 - Diâmetros da cápsula de alginato e cápsulas revestidas.

Figura 5 - Espectro de FTIR do alginato (-) e das cápsulas de alginato (-).

Figura 6 - Espectro de FTIR da cápsula de alginato (-), APM (-), APAM (-) e APACM (-).

Figura 7 - a) cápsula de alginato (alginato marcado com FITC - escala 250 μm); b) APM (ϵ -PLL marcado com FITC - escala 200 μm); c) APAM (alginato marcado com FITC - escala 50 μm); d) APACM (quitosano corado com rodamina B - escala 50 μm).

Figura 8 - Microscopia ótica das cápsulas de alginato após 1 hora numa solução ácida (escala - 150 μm).

Figura 9 - Diâmetro das cápsulas durante a imersão em soluções de KCl-HCl e PBS, respetivamente.

Figura 10 - Cápsulas após 3 horas em meio PBS (com contacto prévio de 1 hora em meio KCl-HCl): a) cápsulas de alginato (alginato marcado com FITC - escala 100 μm); b) APM (ϵ -PLL marcado com FITC - escala 25 μm); c) APAM (alginato marcado com FITC - escala 100 μm); d) APACM (quitosano corado com rodamina B - escala 100 μm).

Figura 11 - Perfil de libertação do folato das cápsulas a 37 °C em PBS; dados experimentais (×) e descrição linear do modelo de superimposição (-) para cápsulas com A) um revestimento, B) dois revestimentos, e C) três revestimentos.

Figura 12 - Acerto do modelo aos dados da libertação de folato das cápsulas com: A) dois revestimentos e B) três revestimentos (resultados experimentais (×) e modelo com $i=2$ (-) e $i=3$ (-)). O gráfico inserido na figura detalha o acerto do modelo na sua parte inicial.

Figura 13 - Viabilidade da LLC durante a simulação da digestão, sendo os primeiros 120 min, correspondentes à simulação da digestão estomacal e os subsequentes 120 min (até 240 min) correspondentes à simulação da digestão intestinal. A azul é a viabilidade da LLC encapsulada e a preto é a viabilidade das LLC livres.

Figura 14 - Produção de ácido láctico e consumo de glucose por *L. plantarum* livre a 30 °C, em meio MRS.

Figura 15 - Validação da capacidade do sistema alojar e ativar os probióticos pela produção de ácido láctico, a 30 °C, em meio MRS.

Figura 16 - Testes de adesão do sistema a células HT-29 e Caco2, com células com 15 e 21 dias de diferenciação.

Figura 17 - APACM em células Caco2 e HT-29 (A e B, respetivamente), imagens de microscopia confocal.

Descrição detalhada

Seguidamente será apresentado um exemplo de elaboração da solução desenvolvida.

Exemplo 1

Produção das cápsulas

As cápsulas de alginato podem ser produzidas por diferentes técnicas, onde podem ser obtidos diâmetros entre 10 e 3000 μm . Neste caso, as cápsulas de alginato foram produzidas por gotejamento de 20 mL de alginato de sódio (CR 8220) com *Lactococcus lactis cremoris* (LLC) ou *Lactobacillus plantarum*, com uma concentração de 1,5% (16 mL de alginato e 4 mL de bactérias LLC) em 100 mL de solução de óleo vegetal com uma concentração de 0,2% de Tween 80. A mistura foi agitada durante 10 min a 200 rpm. Em seguida, uma solução de 200 mL de CaCl_2 (0,05 M) foi suavemente adicionada (durante 20 segundos) e, em seguida, a mistura foi agitada a 200 rpm durante 20 min. Depois a solução foi passada para um funil de separação, onde permaneceu durante 30 minutos. Em seguida, o líquido (óleo e água) foi removido cuidadosamente por aspiração com uma pipeta. O volume residual contendo as cápsulas foi então filtrado através de um filtro de nylon de 100 μm , utilizando água para remover o óleo residual. Após a filtração as cápsulas que passaram através do filtro (menor do que 100 μm) foram centrifugadas durante 5 min a 600 rpm (centrífuga Heraeus Megafuge 1.0R).

Revestimento da cápsula por Camada-por-camada (Layer-by-layer assembly)

Após a produção das cápsulas, estas foram inseridas em 10 ml de uma solução de ϵ -PLL (com uma concentração variando entre 0,01 e 0,5% (m / v)) com agitação constante de 200 rpm durante 15 min, criando uma cápsula com um revestimento de ϵ -PLL. Em seguida, a solução foi centrifugada nas mesmas condições referidas anteriormente. O passo seguinte foi o de imersão das cápsulas (alginato/ ϵ -PLL) numa solução de alginato de sódio (LFR5/60) (0,1-1% (m / v), 10 mL) durante 15 min, sendo depois centrifugada. Em seguida o processo foi repetido mas agora numa solução de quitosano (0,01-0,1% (m / v), 10 mL). Com isto foi obtido a cápsula final conforme descrição.

Resultados

Medições de turbidimetria

Os testes de turbidimetria foram realizadas para demonstrar como estes três compostos interagem entre si. Quanto mais fortes são as interações entre materiais, maiores serão os agregados poliméricos, apresentando assim maior turbidez nas medições espectrofotométricas. Estas interações são promovidas por grupos carregados que levam a interações eletrostáticas entre os materiais. Os materiais utilizados para construir a cápsula e os diferentes revestimentos os seguintes materiais foram utilizados: a) alginato CR 8223, para formar a cápsula sem revestimento, que é um material carregado negativamente num pH acima do seu pKa; b) ϵ -poli-L-lisina, que é um material carregado positivamente em pH abaixo do seu ponto isoelétrico; c) alginato LFR5/60, que é um material carregado negativamente em pH acima do seu pKa; e d) quitosano, que é um material carregado positivamente acima do seu pH.

Para prever a adesão de cada grupo de camada de revestimento, os testes de turbidimetria foram realizadas entre os diferentes materiais. Antes destes testes, a turbidimetria das diferentes soluções foi medida, em valores de pH entre 2 e 8, e os valores absolutos de absorvância nunca foi mais elevada do que 0,08 a.u. A primeira experiência foi realizada com alginato CR 8223 e ϵ -poli-L-lisina. Os resultados mostraram uma melhor interação dos biopolímeros entre pH 5 a pH 6 (Figura 1), sendo estes estatisticamente diferentes de todos as outras experiências, mas não diferentes de pH 4 ($p < 0,05$). Para as outras condições testadas, os valores obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (ou seja, resultados para pH 2, pH 3, a pH 4, pH 7 e pH 8), mas a densidade ótica (DO) apresentada demonstrou ser consideravelmente mais elevada do que a DO das soluções puras (0,08 AU). Estes resultados indicam que as interações eletrostáticas são criadas entre estes materiais durante todos os intervalos de pH testados. Estes resultados podem ser justificados, considerando o pKa de alginato de 3,3 - 3,7 (valores de pKa de ácido manurónico e ácido gulurónico são 3,38 e 3,65) e o ponto isoelétrico da ϵ -poli-L-lisina é de aproximadamente 9, onde no primeiro caso apenas metade dos grupos funcionais do alginato estão carregados e no segundo caso reflete-se na inversão da carga da ϵ -PLL, mudando a sua carga de positiva para negativa. Num pH mais elevado do que o pKa do alginato CR 8223 e menor do que o pI de ϵ -poli-L-lisina é conseguida uma forte interação entre os materiais. A interação entre estes materiais é criada principalmente pela afinidade das cargas entre as moléculas (alginato - carga negativa; ϵ -poli-L-lisina - carga positiva), provando, que as interações eletrostáticas são capazes de promover a interação de materiais diferentes. As interações a pH 2 e 3 podem ser justificadas por uma percentagem baixa de grupos funcionais que ainda se encontram carregados no alginato a estes valores

de pH. Uma unidade abaixo do pKa ainda existem 10% dos grupos funcionais carregados, o que justifica a interação observada nestas condições. Verifica-se deste modo que as interações entre estes dois materiais são mais fortes na gama de pH 4-6.

A mesma experiência foi realizada com soluções de ϵ -poli-L-lisina e alginato LFR5/60, a primeira e segunda camada de revestimento da cápsula, respetivamente. Os resultados mostraram que as interações mais fortes, entre os dois materiais, ocorreram entre pH 3 e 8, sendo estes resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Os valores obtidos a pH 2 são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores obtidos entre pH 3 a 6, mas estatística iguais ($P > 0,05$) para o pH 7 e 8. Tal como já mencionado, esta absorvância apresentada no estudo em pH 2 é justificada por um menor número de grupos funcionais carregados negativamente no alginato, a este pH. Estes resultados têm um comportamento semelhante quando comparado com as interações entre o alginato CR8223 e a ϵ -poli-L-lisina (Figuras 1 e 2) onde as mesmas interações eletrostáticas estão presentes. Também é importante referir que os valores de absorvância são mais elevados, em geral, comparando a interação do alginato LFR5/60 com a ϵ -poli-L-lisina, do que o último com o alginato CR 8223. Este facto pode ser justificado pela maior afinidade dos grupos amina da ϵ -poli-L-lisina com os resíduos glucurônico (presentes no alginato) que se encontram numa percentagem mais elevada no alginato LFR5/60.

As medições de turbidimetria realizadas com alginato LFR 5/60 e quitosano mostraram que o pH, como mencionado antes, influenciou os resultados. Os valores de pKa do alginato e quitosano são 3,3-3,7 e 6,5 (Oliveira *et al.*, 2014), respetivamente, o que cria fortes interações entre os biopolímeros a valores de pH entre 3 e 5, sendo os resultados

estaticamente diferentes ($p < 0,05$) (é importante mencionar que a valores de pH próximos do pKa, representam metade dos grupos funcionais da molécula carregada). Os resultados de pH de 6 a 8 são estaticamente iguais considerando que estes valores estão no pKa do quitosano ou acima disso, o que é um valor de pH menos estável, considerando que o quitosano terá menos grupos funcionais carregados positivamente. Nos valores de pH mais baixos (pH 2) acontece o mesmo comportamento com a molécula de alginato. As mesmas forças eletrostáticas estão presentes na adesão do quitosano, carregado positivamente, com alginato, carregado negativamente, o que cria a interação entre as moléculas que conduzem a elevados valores de turbidez quando essas soluções são misturadas.

Os resultados de turbidimetria mostram a existência de interações entre os biopolímeros usados sendo uma indicação da possibilidade de utilizar estes materiais para a construção de uma cápsula camada-por-camada. Esta avaliação também é importante já que demonstra o comportamento destes materiais a pH 2 e 7 (isto é, o estômago e o intestino), o que dá boas perspectivas da sua utilização num sistema gastrointestinal. Após os ensaios de turbidimetria algumas experiências foram realizadas para otimizar as concentrações das soluções que criaram os revestimentos na cápsula. Estes testes foram conduzidos através da avaliação de diferentes concentrações e tempos de contacto da solução de revestimento.

Caracterização da cápsula

A Figura 4 mostra os diâmetros das cápsulas (cápsula com os revestimentos) após a deposição de revestimentos consecutivos. Durante a deposição de revestimentos sobre a cápsula de alginato, o diâmetro diminui, comparando com a cápsula inicial. Este fenómeno pode ser explicado pelos diferentes

comportamentos desses materiais face a diferentes pH's. O alginato utilizado na produção de cápsulas tem a capacidade de inchar, por meio de hidratação que faz aumentar o volume das cápsulas, por causa da lavagem que acontece no final da produção. Após o desenvolvimento do núcleo principal, as cápsulas foram mergulhadas numa solução de ϵ -PLL, criando a cápsula alginato/ ϵ -PLL (APM), que diminuiu o diâmetro em comparação com o diâmetro da cápsula original. Conforme referido, as cápsulas de alginato não são suficientemente resistentes à digestão, na ausência de ϵ -PLL. A presença desta primeira camada proporciona um aumento da estabilidade mecânica e limita a capacidade de inchamento do sistema. Quando o APM foi adicionado a uma solução de água, o diâmetro foi reduzido pelo revestimento ϵ -PLL. Esta redução de diâmetro pode ser explicada pela limitação que este revestimento cria na capacidade de hidratação, e consequente capacidade de inchamento. A adesão do revestimento consequente criou o alginato/ ϵ -PLL/alginato (APAM) e o alginato/ ϵ -PLL/alginato/quitosano (APACM) que não alterou o diâmetro das cápsulas, sendo os resultados do diâmetro para os três transportadores estatisticamente iguais e diferentes do diâmetro da cápsula de alginato ($p < 0,05$) (Figura 4).

Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados de FTIR revelaram uma semelhança entre as cápsulas e os espectros de alginato de CR 8223, o que indica que a estrutura principal das referidas cápsulas é quimicamente semelhante ao alginato em pó (Figura 5). Comparando os espectros de alginato com os espectros das cápsulas de alginato é possível identificar em ambos, os picos característicos do alginato, 3309 cm^{-1} um pico largo que indica vibrações de alongamento dos grupos OH ligados ao hidrogénio, 1590 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} que representam as vibrações

de alongamento assimétricas e simétricas dos grupos COO^- , respetivamente. Considerando o anel de carbono, outros picos podem ser encontrados na região entre 736 e 1200 cm^{-1} .

Numa apreciação global da figura 6, é possível ver a consequente adesão dos revestimentos sobre as cápsulas de alginato. Comparando-se as cápsulas de alginato e de espectros de APM existem diferenças relevantes, tais como a formação de dois "ombros" de ambos os lados do pico de 1590 , que correspondem à amida I ($\sim 1637\text{ cm}^{-1}$) e à amida II ($\sim 1552\text{ cm}^{-1}$), bandas de absorvância da ϵ -PLL (Tam et al., 2005). A presença desses picos comprova a presença de ϵ -PLL na estrutura APM. A presença de alginato LFR5/60 é difícil de provar considerando que possui espectros iguais à cápsula de alginato, embora seja possível notar que os dois ombros apresentados (APM espectros), característicos da ϵ -PLL, desaparecem no espectro de APAM. Este facto deve-se à deposição do revestimento de alginato na cápsula APM resultando na APAM. Alguns picos característicos podem ser vistos na figura 6 nos espectros APACM, que são característicos da presença de quitosano, tais como as de 1567 cm^{-1} , que são um pico típico da interação entre o grupo carregado negativamente COO^- do alginato e o grupo carregado positivamente NH_3^+ do quitosano, sendo também este pico responsável pela substituição do pico de alginato de 1590 cm^{-1} . Este comportamento pode ser encontrado em outros trabalhos sobre o revestimento de alginato com quitosano. O pico 1729 cm^{-1} pode ser justificado pela protonação do alginato, pelo contato com o quitosano (dissolvido em ácido láctico). Com estes resultados de FTIR é possível comprovar a consequente adesão dos diferentes revestimentos.

Análise por microscopia - Confocal

A montagem camada por camada em cápsulas de alginato também foi avaliada através de microscopia confocal, onde foi possível comprovar a adesão dos diferentes materiais na cápsula durante o desenvolvimento do sistema. O alginato CR 8223, a ϵ -PLL e o alginato LFR5/60 foram marcados com FITC e o quitosano foi marcado com rodamina B. As imagens de microscopia confocal revelaram a existência de cápsulas de alginato (Figura 7a)). A Figura 7b) mostra as cápsulas com ϵ -PLL marcada, sendo esta adesão do revestimento devido às forças eletrostática entre grupos COO^- , a partir do alginato, e NH_3^+ da ϵ -PLL. Na Figura 7c) é possível verificar a adesão da segunda camada de revestimento, composto por alginato LFR5/60, por forças eletrostáticas entre os grupos COO^- , a partir do alginato LFR5/60, e os grupos NH_3^+ , a partir de ϵ -PLL. Considerando-se a adesão do quitosano ao alginato LFR5/60, a Figura 7d) mostra a sua presença com a formação de um último revestimento sobre a cápsula, sendo esta aderência justificada pelas forças eletrostáticas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amina do quitosano (NH_2^+). Com estas imagens de microscopia confocal é possível comprovar a consequente adesão dos revestimentos na estrutura principal da cápsula formando assim a cápsula da presente invenção.

Avaliação da estabilidade das diferentes cápsulas em diferentes pH's

Diferentes ensaios foram realizados de forma a avaliar o diâmetro das cápsulas num meio ácido (KCl-HCl a pH 2, 1 hora), para a simulação de pH do estômago, e num meio de pH neutro (solução de tampão fosfato (PBS) - pH 7,2 - 3 horas), para a simulação de pH intestino. As cápsulas de alginato, mostraram

uma boa resistência para a solução de KCl-HCl, como pode ser visto na figura 8 que representa cápsulas após 1 hora em ambiente ácido. As estruturas apresentaram um diâmetro médio de $33,81 \pm 3 \mu\text{m}$.

Para o teste realizado em meio PBS as cápsulas de alginato tiveram um comportamento diferente. Ao fim de 5 minutos já era impossível ver e medir o diâmetro das cápsulas de alginato, já que se tinham dissolvido totalmente. Este fenómeno da liquefação da estrutura é explicado pela troca de iões entre os iões de sódio presentes na solução de PBS e os iões de cálcio presentes na cápsula de alginato, tais como o ião fosfato, citrato e agentes gelificação que competem pelos iões de cálcio, enfraquecendo assim os géis de alginato. Este processo cria um aumento da repulsão entre os grupos COO^- presentes nas cadeias de alginato que vai criar, no início, um inchaço da estrutura (absorção de água), que leva posteriormente a um colapso total da estrutura da cápsula de alginato. Para evitar a dissolução das cápsulas no meio de PBS, resultante da elevada instabilidade da ligação alginato-Ca em meios iónicos, um revestimento foi adicionado à cápsula de alginato. A adição de um revestimento à cápsula alginato leva a um aumento da resistência da estrutura, evitando a sua dissolução. A Figura 9 mostra o diâmetro das cápsulas durante o contacto com as soluções de KCl e PBS-HCl, onde é possível ver que a) não existe destruição das cápsulas em solução de PBS; b) o diâmetro das capsulas revestidas é estável durante o contacto com os diferentes meios, não havendo nenhuma diferença estatística entre todos os diâmetros das diferentes capsulas para o KCl-HCl ($p > 0,05$) que apresentam um diâmetro médio de $20 \mu\text{m}$ (apr.). O mesmo acontece com os resultados de diâmetro para a solução de PBS, em todos os sistemas revestidos ($p > 0,05$), apresentando um diâmetro médio de $40 \mu\text{m}$ (apr.), e c) existe um grau de inchamento de cerca de 2 vezes

do diâmetro das capsulas na solução de KCl-HCl para a solução de PBS, sendo esses resultados (resultados KCl-HCl e PBS) estatisticamente diferentes entre si. O revestimento de PLL-ε mostrou que era capaz de proteger a estrutura contra a troca de iões, que leva a um grau de inchamento elevado.

A fim de avaliar se os revestimentos perderam a sua aderência nos meios de KCl-HCl e PBS, ensaios de microscopia confocal foram realizados para avaliar as diferentes camadas. A Figura 10 mostra que os três revestimentos estão presentes durante o ensaio, sendo para cada ensaio cada camada de revestimento foi marcada com um corante (ε-poli-L-lisina e alginatos com FITC e quitosano com rodamina B), sendo que a avaliação foi realizada após 3 horas no meio PBS (com um contacto prévio de 1 hora com a forma de KCl-HCl). Os resultados mostraram a integridade do sistema, isto é, a adesão dos três revestimentos à estrutura principal, após a passagem pelos meios com pH's que simulam as condições gastrointestinais.

Cinéticas de libertação de ácido fólico em tampão fosfato (pH 7 e 37 °C)

Para avaliar os mecanismos de libertação de folato das cápsulas testou-se a libertação de ácido fólico a 37 °C (temperatura do interior do corpo humano) e a pH 7 (pH do intestino). A fim de avaliar os mecanismos físicos envolvidos na libertação de folato das cápsulas com diferentes revestimentos, é importante usar um modelo que descreva com sucesso as contribuições individuais da difusão e dos processos de relaxamento. O modelo de superposição linear foi ajustado aos dados experimentais: relativamente à libertação por Fick (MF) e à libertação por relaxamento (MR). Este modelo assume que o mecanismo de transporte da cápsula: i) pode ser devido apenas ao gradiente de concentração, não tendo assim o relaxamento do polímero qualquer efeito sobre o mecanismo de

transporte, isto é, a libertação é apenas por Fick ($i = 0$); ii) ou o transporte pode ser devido à soma de gradiente de concentração e o relaxamento da matriz de polímero ($i \neq 1$).

A partir da Figura 11 é possível analisar que a aplicação de revestimentos em diferentes cápsulas conduz a alterações no perfil de libertação do folato. A fim de avaliar os mecanismos de libertação do sistema com diferentes revestimentos, os resultados experimentais foram ajustados ao modelo LSM (Equação 5). Para cada revestimento aplicado na cápsula, LSM ajustou as curvas mostrando uma boa descrição dos dados experimentais (Figura 11). Isto indica que este mecanismo de transporte não pode ser só descrito por movimentos brownianos de libertação de folato, ou seja, não segue estritamente o comportamento de Fick, mas é governado também por transporte II (relaxamento). Além disso, observou-se que, dependendo do revestimento aplicado na cápsula, este sistema é regulado por dois ou mais processos de relaxamento.

A Tabela 1 apresenta uma análise de regressão dos resultados do ajustamento por LSM, que demonstra que este modelo se ajusta aos resultados ($R^2 > 0.90$) e que quase todos os parâmetros demonstram uma boa precisão.

Tabela 1: Resultados do Modelo de Superimposição (LSM) aos resultados de libertação de folato das cápsulas. A qualidade de regressão baseia-se na avaliação de RMSE e R^2 . A precisão da estimativa é avaliada pelo parâmetro SHW%.

Revestimen to	R^2	RMSE	$D(m^2/m$ in)	M_F	K_F	M_{R1}	K_{R1}	M_{R2}	K_{R2}	M_{R3}	K_{R3}
1° revestimen to ϵ -PLL	0,97 39	0,14 73	$3,73 \times 10^{-13}$	0,8135 (17,95 %)	0,0003 (29,76 %)	0,3274 (1,74%)	0,0003 (33,39 %)	0,2925 (19,78 %)	0,031 (37,90 %)	-	-
2° revestimen to Alginato	0,94 37	0,37 92	$1,256 \times 10^{-13}$	0,7645 (20,12 %)	0,0001 (30,42 %)	0,2259 (37,21 %)	0,0001 (18,12 %)	0,0509 (27,23 %)	0,029 (24,32 %)	0,2326 (30,25 %)	0,0002 (50,44 %)
3°revestim ento Quitosano	0,90 93	0,64 73	$1,256 \times 10^{-13}$	0,7576 (30,27 %)	0,0001 (70,2%)	0,2169 (35,4%)	0,0001 (27,28 %)	0,2170 (30,12 %)	0,0002 (50,52 %)	0,1169 (27,32 %)	0,0002 (76,98 %)

O ajuste do modelo LSM para os dados experimentais mostram que os mecanismos envolvidos na libertação de folato são compostos pela contribuição da difusão por Fick (MF) e dois ou mais processos de relaxamento (MR). A aplicação do primeiro revestimento na cápsula (ϵ -PLL) sugere que a difusão por Fick é o principal mecanismo de libertação de folato. Estes resultados podem ser explicados com base em fortes interações eletrostáticas entre o alginato CR 8223 e a ϵ -PLL, a pH 7 (pH da solução de PBS). Como mencionado acima, com este pH a interação entre estes materiais é criada principalmente pela alta afinidade das cargas entre as moléculas (alginato - carga negativa; ϵ -poli-L-lisina - carga positiva). Ao aumentar o número de revestimentos na cápsula é criada uma diminuição na contribuição da difusão por Fick, havendo assim três etapas de relaxamento na libertação de folato. A Figura 12 mostra que o transporte anómalo considerando dois relaxamentos ($i = 2$) não foi capaz de prever o comportamento observado experimentalmente. Isto reflete o facto de com estes dois últimos revestimentos a estrutura é mais instável, o que significa que as interações eletrostáticas entre as cápsulas

APAM e APACM são mais fracas. Isto leva à diminuição da estabilidade da estrutura que promove a libertação de folato devido ao relaxamento do polímero em diferentes momentos. Além disso, a constante da taxa de relaxamento (K_r) diminuiu com o aumento dos revestimentos, sustentando esta hipótese. Além disso, a constante de velocidade de Fick (K_F), tal como esperado, diminuiu com o aumento do número de revestimentos, refletindo a diminuição de predominância de comportamento de Fick.

O coeficiente de difusão (D) foi influenciado pela composição dos revestimentos. A aplicação de um segundo revestimento fez o D diminuir de 3.73×10^{-13} para 1.256×10^{-13} m²/min e este último valor permaneceu constante para o terceiro revestimento. Estes resultados sugerem que a aplicação do segundo revestimento leva a uma liberação lenta do folato.

Viabilidade dos probióticos encapsulados com a cápsula desenvolvida

O revestimento de microcápsulas aumenta a capacidade destes sistemas para proteger os probióticos em condições gastrointestinais. Neste trabalho, uma simulação de uma digestão gastrointestinal foi realizada para estudar como o sistema seria capaz de proteger o probiótico em condições adversas. Os resultados de viabilidade são apresentados na Figura 13. A experiência com o *Lactococcus lactis creomris* (LLC) livre mostrou uma morte instantânea da maior parte do LLC já nos primeiros momentos da fase estomacal do processo digestivo. Os mesmos resultados também foram obtidos por outros autores em que houve uma morte instantânea da maior parte, ou mesmo todas, das bactérias livres durante o teste de simulação de estômago. A presença de três revestimentos tem

diferentes fins, como mencionado anteriormente. A Figura 13 mostra os resultados deste teste. Após a primeira hora, a viabilidade da LLC livre diminuiu para menos de 4 log CFU, enquanto que nenhuma LLC estava viável depois de 90 min. A viabilidade da LLC encapsulada também diminuiu durante a primeira hora, embora tenha permanecido estável até ao final da experiência, com um valor de 6 log CFU. Estes resultados permitem-nos concluir que APACM é capaz de proteger o LLC durante a simulação de digestão gastrointestinal.

Validação da capacidade de troca de nutrientes da cápsula

De forma a validar a capacidade do sistema ativar os probióticos, quando encapsulados, um teste de produção e libertação de ácido láctico foi realizado. A *Lactobacillus plantarum* foi encapsulada e a validação da capacidade de troca de nutrientes foi realizada através da quantificação da glicose e ácido láctico, isto é, a fonte de carbono e o produto de fermentação, respetivamente. Estes testes foram realizados em meio MRS, sendo a *L. plantarum* livre estudada inicialmente num ensaio e a *L. plantarum* encapsulada no seguinte. Todas as amostras foram analisadas por HPLC e os resultados são apresentados na Figura 14 e a Figura 15.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 14, é possível concluir que a *L. plantarum* é capaz de uma produção elevada de ácido láctico e ao mesmo tempo é capaz de alcançar um consumo total de glicose em aproximadamente 30 h. Vale a pena mencionar que no final da fermentação de *L. plantarum* um valor de 8 Log CFU.mL⁻¹ foi conseguido e a partir daí as bactérias foram totalmente dedicadas à produção de ácido láctico, produzindo 5 gL⁻¹ em 7 h (entre 20 h e 27 h de tempo de fermentação).

Comparando com as Figuras 14 e 15 pode-se concluir que o consumo de glicose e a consequente produção de ácido láctico foi mais lenta no ensaio com a *L. plantarum* encapsulada (Figura 15) do que no ensaio livre (Figura 14). O principal objetivo deste teste foi demonstrar a capacidade da cápsula inventiva para ativar a *L. Plantarum* encapsulada, pelo consumo da glicose e consequente produção de ácido láctico, sendo posteriormente o ácido libertado da cápsula. Pelos resultados da figura 15 é possível verificar que houve a produção de ácido láctico por bactérias encapsuladas, provando assim que o sistema funciona tal como previsto.

Testes de adesão da cápsula a células Caco2 e HT-29

Uma importante função da cápsula é a sua capacidade para aderir ao epitélio intestinal. O sistema foi assim testado em células Caco2 e HT-29, com 15 e 21 dias de diferenciação das células, como mostrado na Figura 16. Os resultados mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados aos 15 e 21 dias de diferenciação, para ambos os tipos de células. O estudo de adesão às células demonstrou que as cápsulas têm a capacidade de aderir as células epiteliais, mostrando que houve uma aderência de 38% às células HT-29 e 33% às células Caco2. As cápsulas aderidas às células Caco2 e HT-29 são apresentadas na Figura 17. Esta diferença pode ser devido à pequena produção de mucina pelas células HT-29, que aumenta a capacidade de adesão ao quitosano.

Estes resultados estão em conformidade com as cápsulas de quitosano revestidas em que se conseguiu uma percentagem de aderência de 38%. Outro exemplo é o trabalho realizado com lipossomas revestidos com quitosano, onde 45% da adesão foi obtida em um estudo in vivo em ratos.

BIBLIOGRAFIA

Ali, M., Zanjani, K., & Ghiassi, B. (2014). Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition, *13*(August 2013), 843-852.

Baggott, J. E., Oster, R. a, & Tamura, T. (2012). Meta-analysis of cancer risk in folic acid supplementation trials. *Cancer Epidemiology*, *36*(1), 78-81.
<http://doi.org/10.1016/j.canep.2011.05.003>

Bailey, S. W., & Ayling, J. E. (2009). The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(36), 15424-9.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0902072106>

Butel, M.-J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *44*(1), 1-8.
<http://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>

Ching, S. H., Bhandari, B., Webb, R., & Bansal, N. (2014). Visualizing the interaction between sodium caseinate and calcium alginate microgel particles. *Food Hydrocolloids*, 1-7.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.013>

Cook, M. T., Tzortzis, G., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *Journal of Materials Chemistry B*, *1*(1), 52. <http://doi.org/10.1039/c2tb00126h>

de Meer, K., Smulders, Y. M., Dainty, J. R., Smith, D. E. C., Kok, R. M., Stehouwer, C. D. a, ... Jakobs, C. (2005). [6S]5-

methylnetetrahydrofolate or folic acid supplementation and absorption and initial elimination of folate in young and middle-aged adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(12), 1409-16. <http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602254>

Dragnet, K. I., Stokke, B. T., Yuguchi, Y., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2000). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 3. Alginic acid gels. *Biomacromolecules*, 4(6), 1661-8. <http://doi.org/10.1021/bm034105g>

Gardiner, G. E., Casey, P. G., Casey, G., Brendan, P., Lawlor, P. G., Hill, C., ... Lynch, P. B. (2004). Relative Ability of Orally Administered *Lactobacillus murinus* To Predominate and Persist in the Porcine Gastrointestinal Tract Relative Ability of Orally Administered *Lactobacillus murinus* To Predominate and Persist in the Porcine Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1895-1906. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1895>

Gueimonde, M., & Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 38 Suppl 2, S242-7. [http://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60003-6](http://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60003-6)

Hugenschmidt, S., Schwenninger, S. M., & Lacroix, C. (2011). Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. *Process Biochemistry*, 46(5), 1063-1070. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.021>

Klingberg, T. D., & Budde, B. B. (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five

potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 157-9.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.014>

Li, M. G., Lu, W. L., Wang, J. C., Zhang, X., Wang, X. Q., Zheng, A. P., & Zhang, Q. (2007). Distribution, transition, adhesion and release of insulin loaded nanoparticles in the gut of rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), 182-191. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.040>

Loveday, S. M., & Singh, H. (2008). Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 19(12), 657-668.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.08.002>

Marteau, P., & Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 725-740.
[http://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00055-6](http://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00055-6)

Morris, M. C., & Tangney, C. C. (2007). Is dietary intake of folate too low? *Lancet*, 369, 166-167.

O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 189-205.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025>.

Oliveira, T. M. B. F., Barroso, M. F., Morais, S., Araújo, M., Freire, C., Lima-neto, P. De, ... Delerue-matos, C. (2014). Sensitive bi-enzymatic biosensor based on polyphenoloxidases - gold nanoparticles - chitosan hybrid film - graphene doped carbon paste electrode for carbamates detection.

Bioelectrochemistry, 98, 20-29.
<http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.02.003>

Sarker, B., Rompf, J., Silva, R., Lang, N., Detsch, R., Kaschta, J., ... Boccaccini, A. R. (2015). Alginate-based Hydrogels with Improved Adhesive Properties for Cell Encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 72-78.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.061>

Sauvant, P., Cansell, M., Hadj Sassi, A., & Atgié, C. (2012). Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. *Food Research International*, 46(2), 469-479. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.025>

Sekhon, B. (2010). Food nanotechnology - an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3, 1-15.

Suwannateep, N., Banlunara, W., Wanichwecharungruang, S. P., Chiablaem, K., Lirdprapamongkol, K., & Svasti, J. (2011). Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation. *Journal of Controlled Release*, 151(2), 176-182.
<http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.011>

Tam, S. K., Dusseault, J., Polizu, S., Ménard, M., Hallé, J. P., & Yahia, L. (2005). Physicochemical model of alginate-poly-l-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS. *Biomaterials*, 26, 6950-6961.
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.007>

Ulrich, C. M., & Potter, J. D. (2006). Folate supplementation: too much of a good thing? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(2), 189-93.

<http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-152CO>

Wall, R., Ross, R. P., Shanahan, F., Mahony, L. O., Mahony, C. O., Coakley, M., ... Stanton, C. (2009). Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues 1 - 3, (1). <http://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27023>.

Braga, 08 de julho de 2016

REIVINDICAÇÕES

1 - Cápsula para transportar probióticos caracterizada por compreender:

- um núcleo constituído por alginato onde estão compreendidos probióticos ativos;
- uma camada de revestimento interno de poli-L-lisina;
- uma camada de revestimento intermédia de alginato e
- uma camada de revestimento externo de quitosano,

e em que a referida cápsula é permeável aos nutrientes e o seu diâmetro varia consoante o pH do meio.

2. Cápsula, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a poli-L-lisina ser preferencialmente a ϵ -poli-L-lisina.

3. Cápsula, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a ϵ -poli-L-lisina estar a uma concentração entre 0.001% a 0.8% (m/v).

4. Cápsula, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a ϵ -poli-L-lisina estar com uma concentração preferencialmente de 0.01% a 0.5% (m/v).

5. Cápsula, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o alginato estar a uma concentração entre 0.001% e 1% (m/v).

6. Cápsula, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por o alginato estar com uma concentração preferencial entre 0.1% e 1% (m/v).

7. Cápsula, de acordo com as reivindicações de 1 a 6, caracterizada por a concentração de quitosano variar entre 0.0005% e 0.9% (m/v).

8. Cápsula, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a concentração de quitosano variar preferencialmente entre 0.01% e 0.1% (m/v).

9. Cápsula, de acordo com as reivindicações de 1 a 8, caracterizada por compreender um diâmetro entre 10 a 3000 μm .

10. Cápsula, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por o diâmetro ser preferencialmente 10 a 100 μm .

11. Cápsula, de acordo com as reivindicações de 1 a 10, caracterizada por ser um transportador.

12. Cápsula, de acordo com as reivindicações de 1 a 11, caracterizada por os probióticos estarem num estado fisiológico ativo no seu interior.

13. Cápsula, de acordo com as reivindicações 1 a 12, caracterizada por o seu diâmetro aumentar quando está em contacto com pH neutro.

14. Cápsula, de acordo com as reivindicações 1 a 13, caracterizada por aderir às células estaminais através do quitosano.

15. Cápsula, de acordo com as reivindicações 1 a 14, caracterizada por ser usada nos sectores farmacêutico ou agro-alimentares.

Braga, 08 de julho de 2016

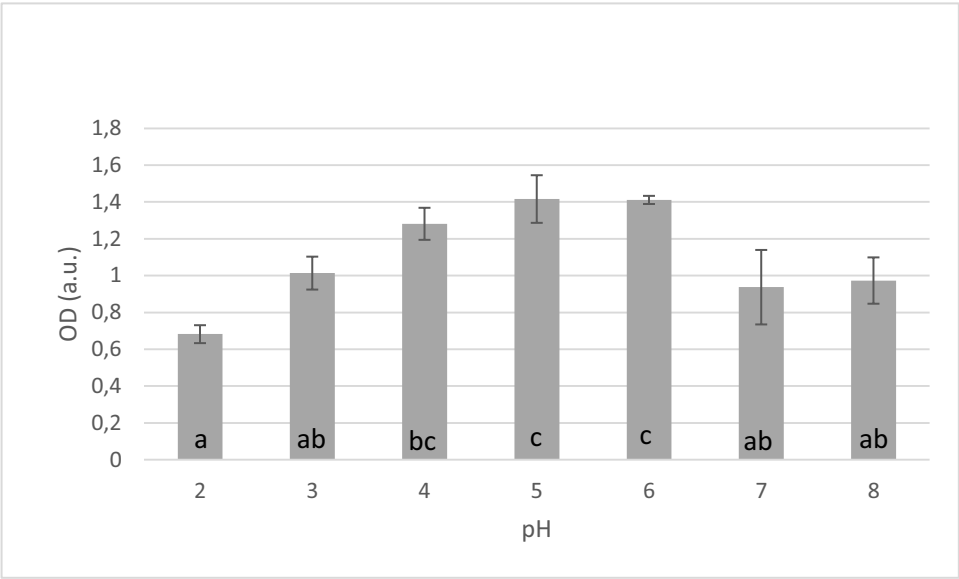


Figura 1

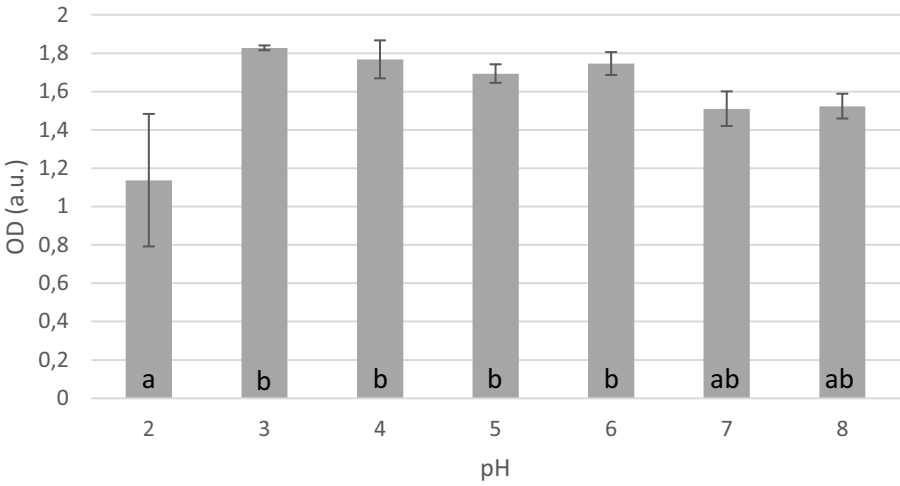
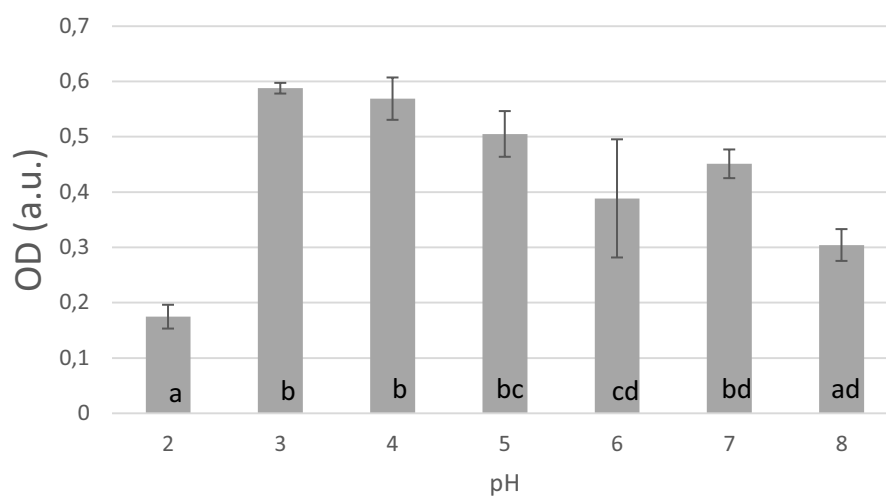
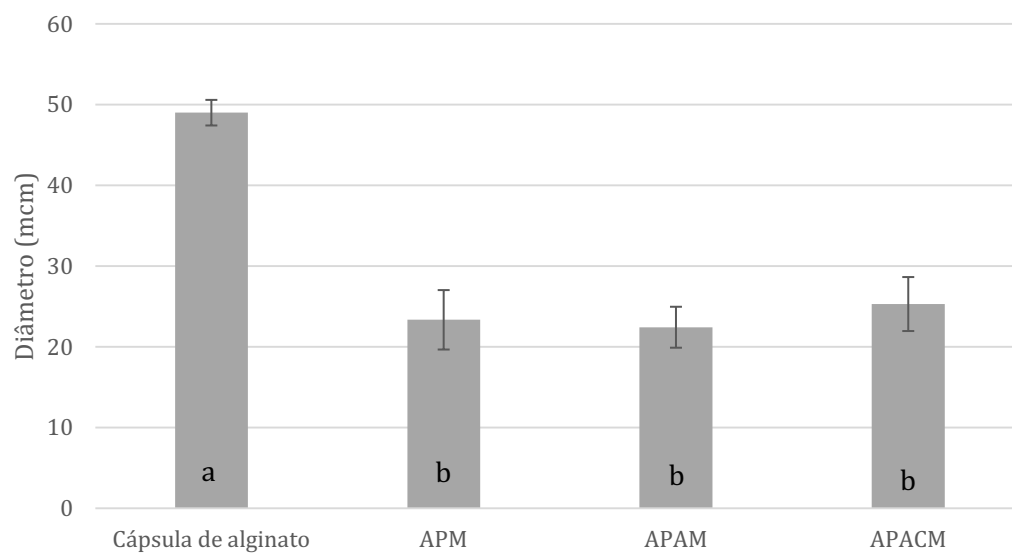


Figura 2

**Figura 3****Figura 4**

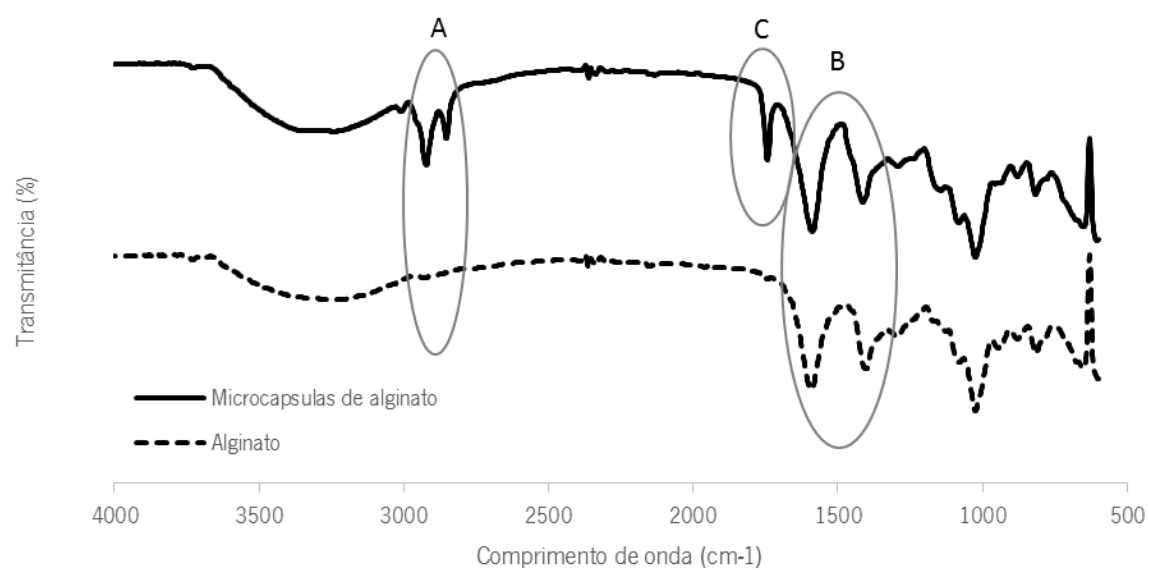


Figura 5

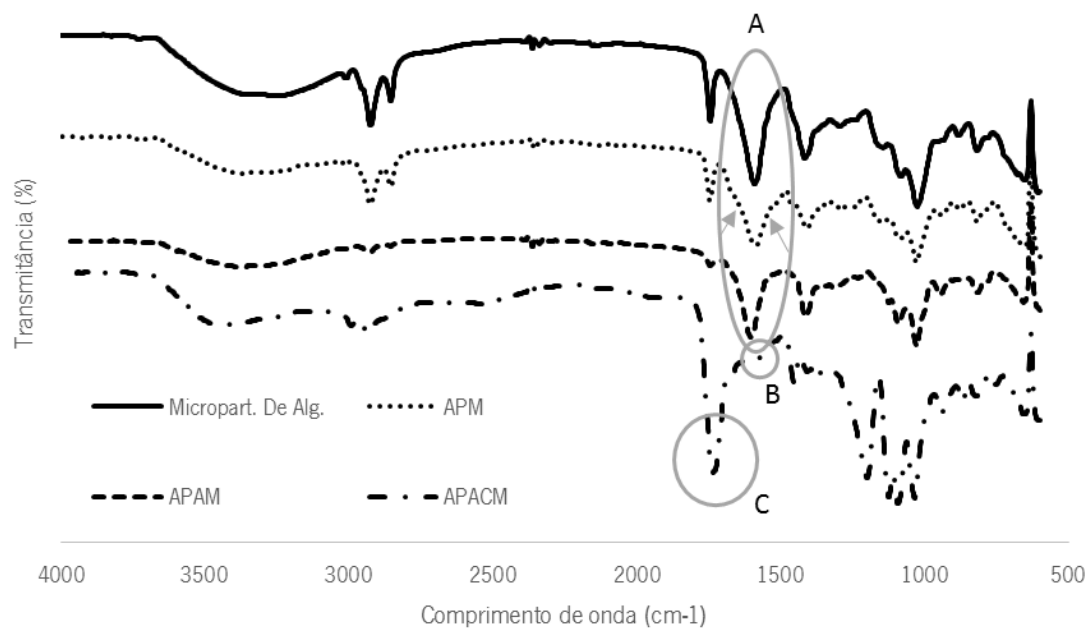


Figura 6

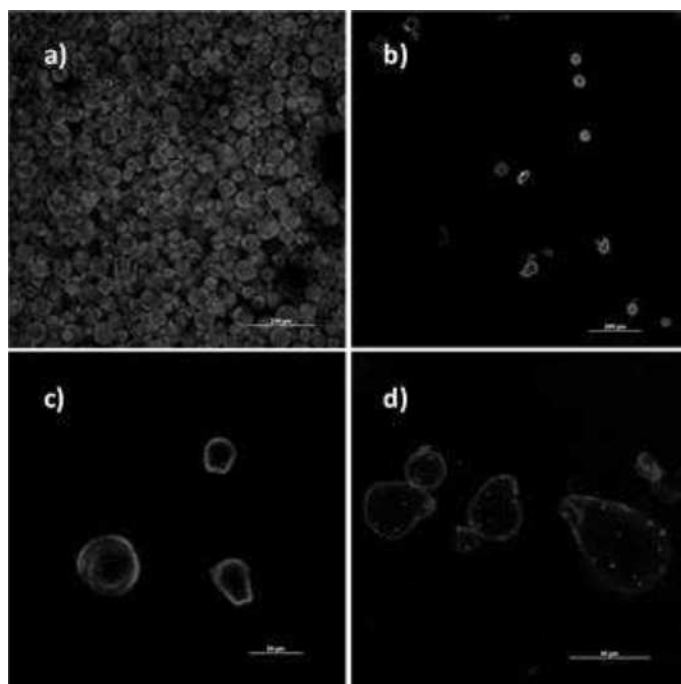


Figura 7

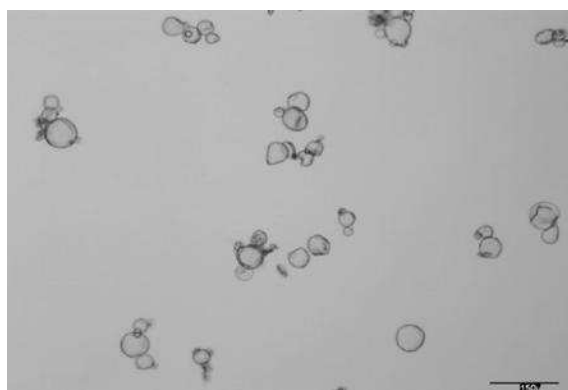


Figura 8

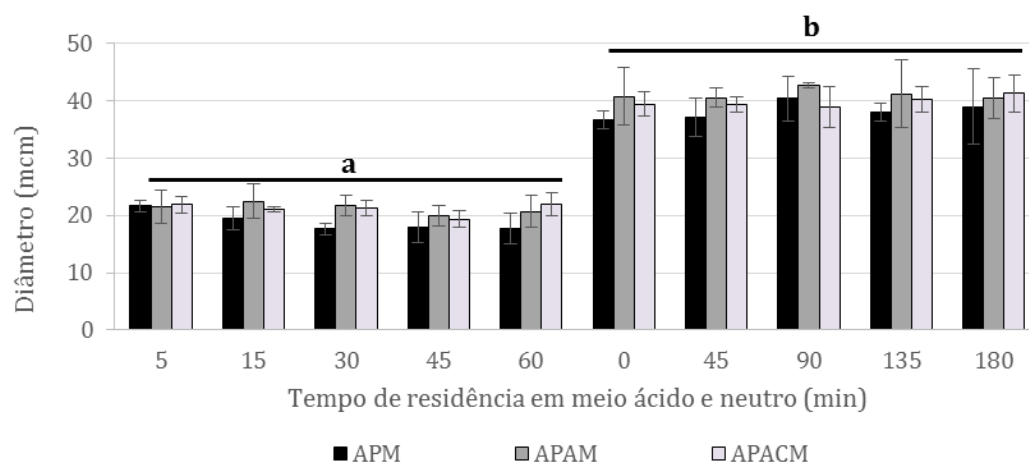


Figura 9

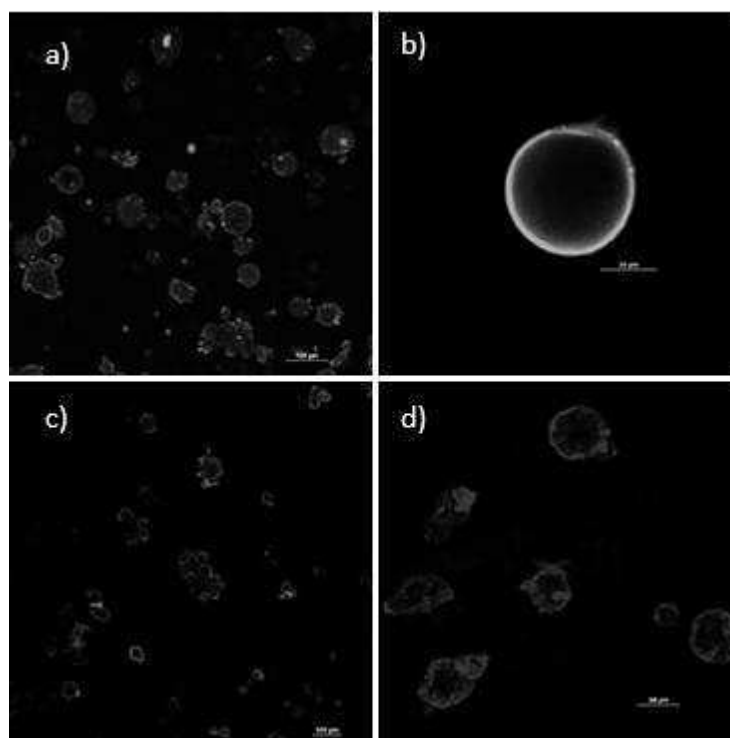
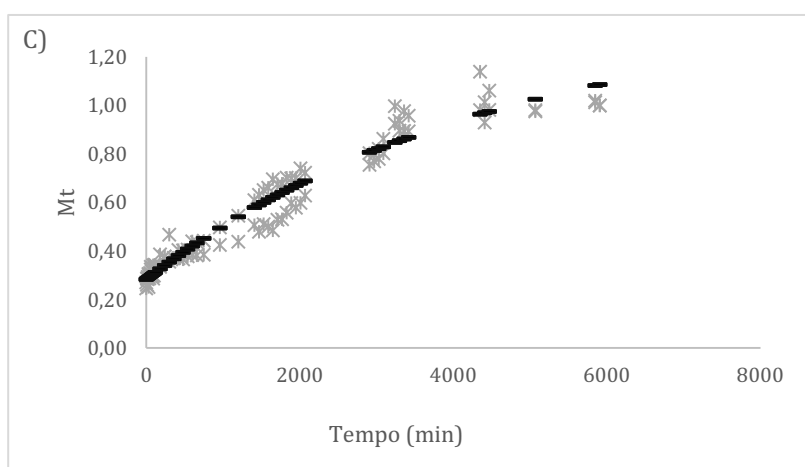
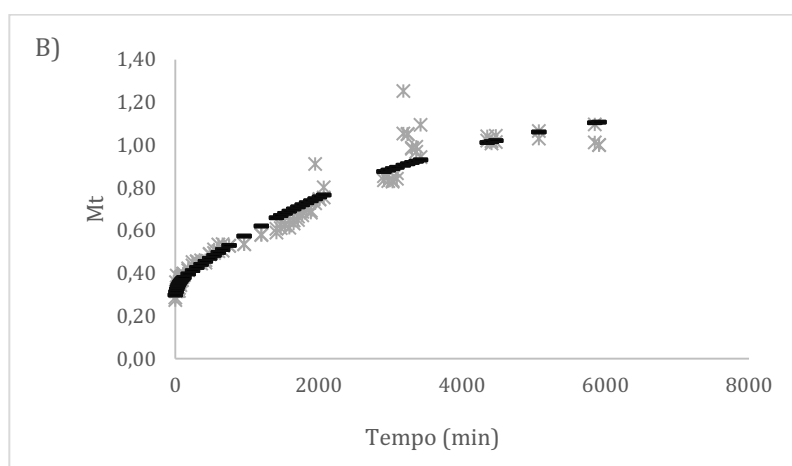
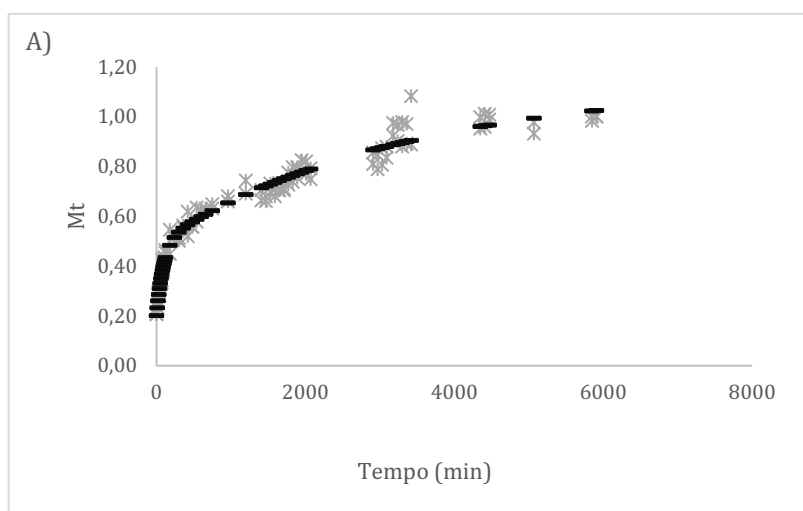


Figura 10

**Figura 11**

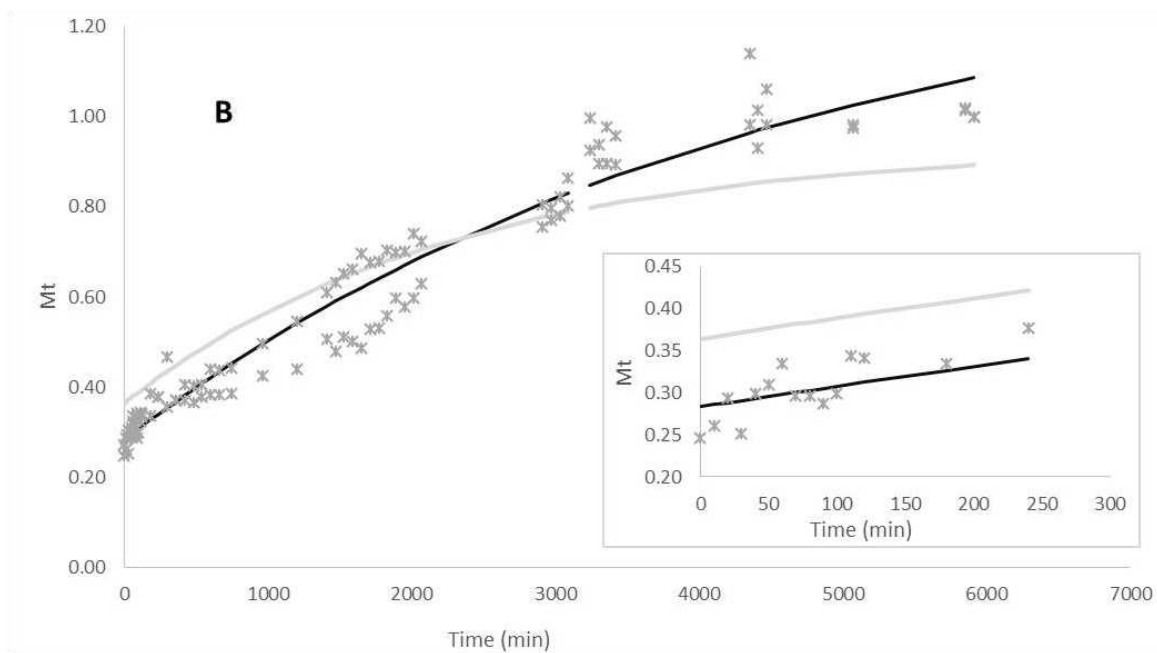
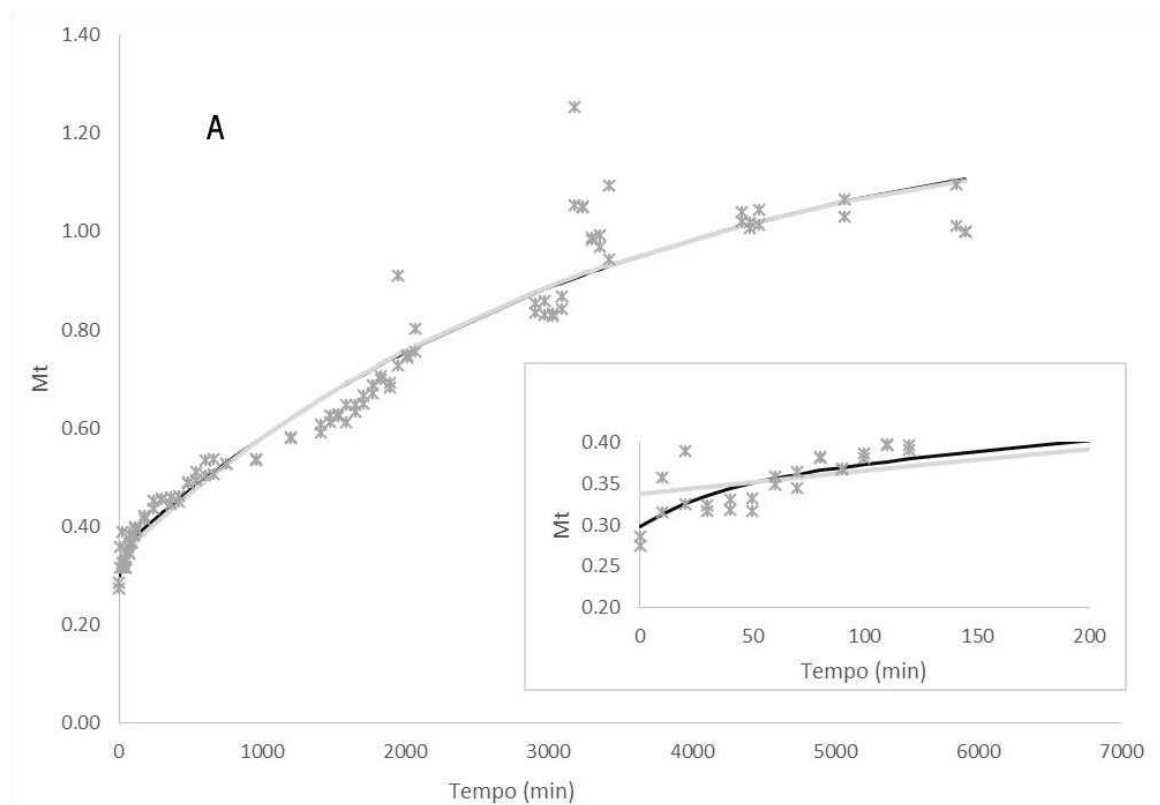


Figura 12

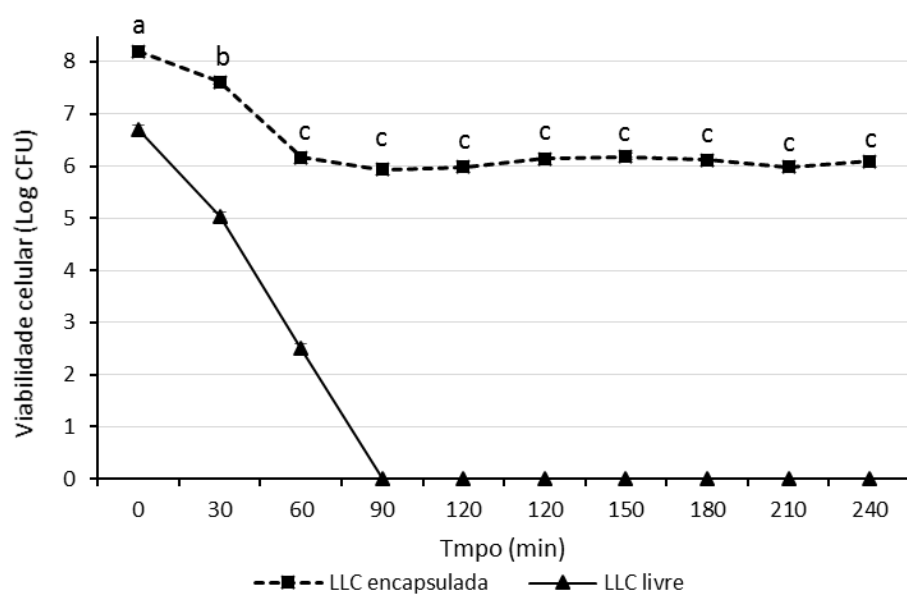


Figura 13

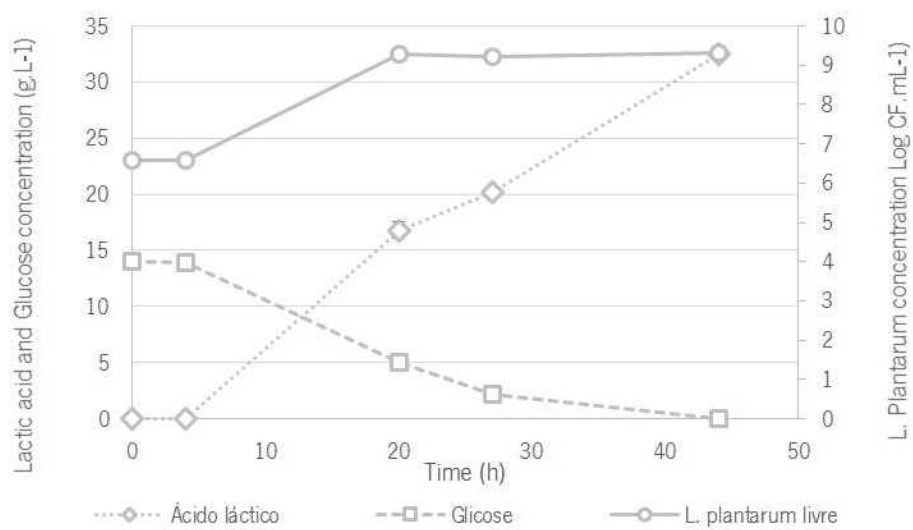


Figura 14

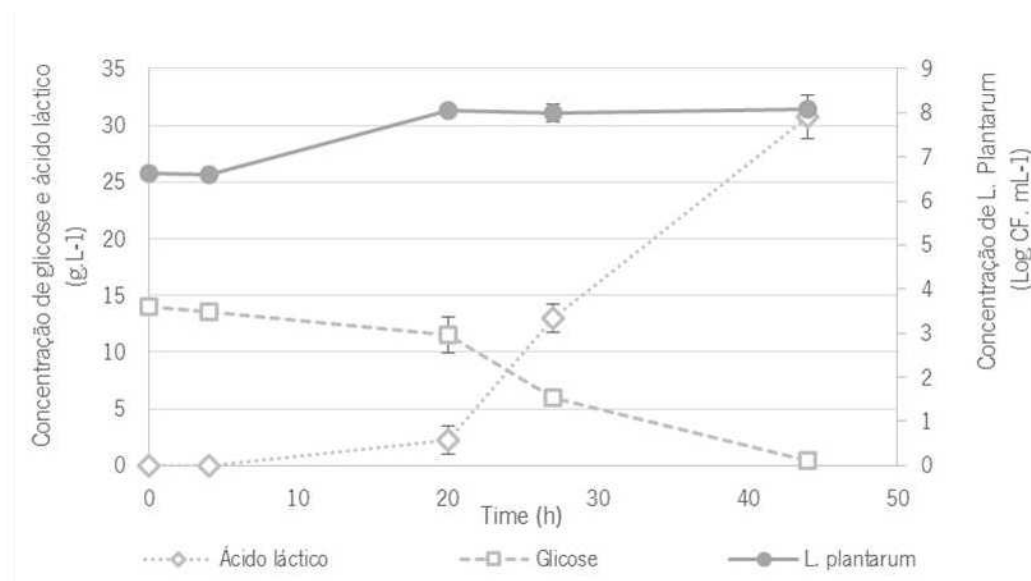


Figura 15

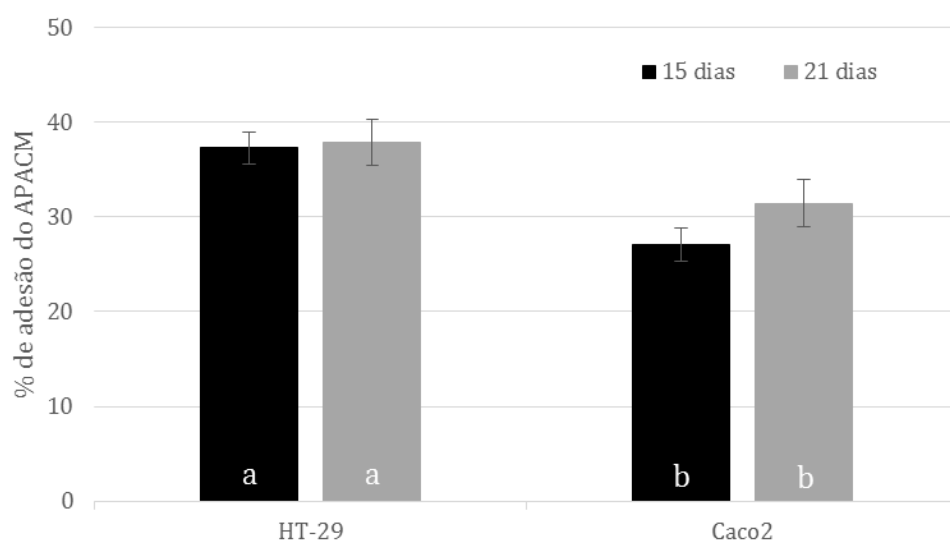


Figura 16

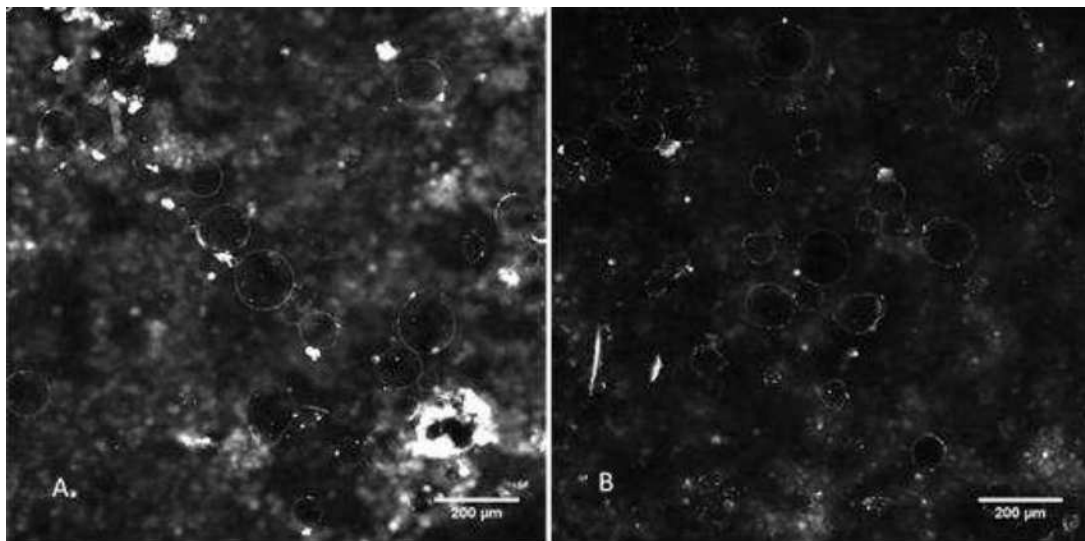


Figura 17